Flow-Count™
標準粒子

REF **7547053 – 200 テスト**

PN 7507992-M

CE BECKMAN COULTER®

COULTER® EPICS™ XL™/XL-MCL™、 Cytomics FC 500 および同等のフローサイトメトリー システムでの絶対数測定

用途
Flow-Count 標準粒子は、EPICS XL/XL-MCL、Cytomics FC 500、または同等のフローサイトメトリー システムを使用して、検体中のリンパ球、リンパ球サブセット、CD34+細胞の陽性率と絶対数を直接測定するための蛍光標準粒子です。

用途、臨床的意義、フローサイトメトリー測定用検体の採取、染色、溶血方法の指示など試薬の詳細な情報については、製品の取扱説明書を参照してください。

概要および説明
(開発の経緯および特徴)
総白血球数と % リンパ球値は通常、自動血球計数装置でカウントされたリンパ球数に、フローサイトメトリーで測定された陽性染色血球比率を乗じて得られます。しかし、この標準（間接）法は大幅な施設間変動に関連します。[1-4] Flow-Count 標準粒子は、標準（間接）法に代わる効果的な絶対数取得方法で、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原のシングルプラットフォーム測定で絶対数を直接測定することができます。検体と Flow-Count 標準粒子の量が等しい場合、蛍光粒子に対する検体中の細胞の割合がわかります。目的とする細胞と標準粒子は、EPICS XL/XL-MCL、Cytomics FC 500、または同等のフローサイトメトリー システムでカウントされます。標準粒子の濃度があらかじめ分かっているため、細胞の絶対数は以下の計算式を使用して算出できます:

$$\text{目的細胞の絶対数（細胞 / µL）} = \frac{\text{目的細胞の細胞数}}{\text{Flow-Count の測定数}} \times \text{Flow-Count 標準粒子アッセイ値}$$

測定原理
Flow-Count（直接）法では、既知量（100µL）および濃度の Flow-Count 標準粒子と同量（100µL）の検体を混和します。検体を製品の取扱説明書に従って調製します。調製したサンプルにFlow-Count 標準粒子を加えます。フローサイトメーターで測定した後、アッセイ値を用いて、マニュアル、または装置のソフトウェアで自動的に絶対数が計算されます。

試薬
Flow-Count 標準粒子
PN 7547053 – 200 テスト（20mL x 1）

試薬の構成
Flow-Count 標準粒子は、界面活性剤と 1% のホルムアルデヒドを含む水溶性媒体に懸濁した10µm（名目値）のポリスチレン蛍光粒子です。標準粒子は、488nmで励起したときに 525nm から 700nm の蛍光を発する色素を含みます。Flow-Count 標準粒子のアッセイ値は、コールター粒度分布アナライザによる繰り返し測定で得られています。

試薬の調製
調製の必要はありません。Flow-Count 標準粒子は、希釈せずに容器から直接使用します。容器上部に熱接着されたアルミニウムを全て取り除いてください。ピペットで容器から分取する前に、よく攪拌します（10秒から 12秒）。

警告（使用上または取扱上の注意）
1. この試薬は 1% のホルムアルデヒドを含みます。ホルムアルデヒドは組織に致命的な危険を招くことがあるため、皮膚や目への接触を避けてください。蒸気を吸い込まないでください。手袋や保護眼鏡など適切な安全防具を着用してください。
2. Flow-Count 標準粒子は容器から直接使用します。Flow-Count 標準粒子は小分け分注または冷凍しないでください。誤った結果が生じる恐れがあります。
3. 容器上部に熱接着されたアルミニウムを全て取り除いてください。残留したアルミニウムがホルムアルデヒドと反応し、Flow-Count 標準粒子の外観が変化することがあります。
4. 開栓後は Flow-Count 標準粒子を立てて保存し、漏出を避けてください。
5. 検体および検体に触れたものはすべて感染性があるものとして取り扱い、適当な処理をした上で廃棄してください。
6. 口では絶対に検体をピペッテイングしないで下さい。また、皮膚や粘膜に触れないようにしてください。
7. バイアルのラベルに表示された有効期限を過ぎたFlow-Count 標準粒子は使わないでください。
8. 信頼性のあるデータを得るために、検体と Flow-Count 標準粒子の分注には、キャリブレートした容積式またはリピーターピペットを使用してください。
9. 信頼性のあるデータを得るために、メーカーの推奨するピペット使用法で、サンプルとFlow-Count 標準粒子を正確かつ精密にピペッティングしてください。
10. Flow-Count 標準粒子は長期間にわたり安定です。使用前に、蛍光粒子が完全に再懸濁していることを確認してください。気泡ができるような過剰な攪拌はしないでください。信頼性のあるデータを得るために、気泡をピペットで吸わないようにしてください。
11. 指定外のインキュベーションまたは混和時間、あるいは温度により、誤った結果が生じる恐れがあります。
12. 調製したサンプルは、Flow-Count 標準粒子添加後 2時間以内にフローサイトメーターで測定する必要があります（製品の取扱説明書を参照してください）。
13. Flow-Count 標準粒子はビーズの濃度（個/µL）が Lot 毎に明記されています。絶対数の測定には、正しいアッセイ値が使用されていることを確認してください。
14. 信頼性のあるデータを得るために、少なくとも 1,000イベント以上 の Flow-Count 標準粒子がカウントされていることを確認してください。
15. 保存または使用中に Flow-Count 標準粒子を強い光に晒さないでください。
16. Flow-Count 標準粒子が微生物に汚染されないように注意してください。汚染されると誤った結果が生じる恐れがあります。
17. 信頼性のあるデータを得るために、Flow-Count 標準粒子とサンプルが蒸発したり漏れたりしないように注意してください。
18. 洗浄操作を要するサンプル調製方法は、想定外の細胞の損失が起こりうるため、避けてください。
19. 皮膚と接触すると刺激を生じることがあります。
20. 目に接触した場合は、直ちに大量の水で洗い流し、医師の診断を受けてください。
21. 適切な防護用衣服、手袋、および目や顔面の保護用具を着用してください。
22. 事故が発生した場合、または気分が悪くなった場合には、直ちに医師の診断を受けてください（可能な場合にはラベルを医師に提示）。
23. 換気のよい場所でのみ使用してください。
24. 発癌性に関する知見が得られています。

貯法及び有効期間
重要:開栓後は Flow-Count 標準粒子を立てて保存し、漏出を避けてください。

Flow-Count 標準粒子は、2-8° C で保存すればバイアルのラベルに表示された有効期限まで使用できます。バイアル開栓後の Flow-Count 標準粒子は、遮光し、2-8° C で保存した場合、30日間安定です。冷凍したり光に晒したりしないでください。Flow-Count 標準粒子は室温（20-25° C）に戻してからご使用ください。

Flow-Count 標準粒子を加えて準備したサンプルは、調製後2時間以内に測定してください。

変質や劣化の兆候
蛍光粒子を懸濁させたときの Flow-Count 標準粒子の外観（正常な外観は不透明で無色の液体)、あるいは 2次ピークがビーズ全体の 20% 以上を含むなどの場合は、製品が劣化している可能性があるため、使用しないでください。

検体の採取と調製
測定対象となる各アプリケーションに関連する操作手順については、製品の取扱説明書を参照してください。

絶対数決定の手順

構成試薬
Flow-Count 標準粒子
PN 7547053 – 200 テスト（20mL x 1）

その他に必要な試薬等
適切なモノクローナル抗体で染色し、COULTER® IMMUNOPREP™ 試薬システムで溶血したサンプル、または
Stem-Kit™ 試薬で染色し、NH_4Cl 10 倍液から調製した溶血剤で調製したサンプル
リピーターピペット（100 µL）とチップ、または
容積式ピペット（100µL）とチップ
タイマー
ボルテックスミキサー
EPICS XL/XL-MCL、Cytomics FC 500、または同等のフローサイトメトリー システム

Flow-Count 標準粒子の使用手順
1. 調製済みのサンプルの試験管を用意します。

重要:最良の結果を得るには、正確かつ精密な手技で 100µL のサンプルまたは Flow-Count 標準粒子を試験管に分注する必要があります。メーカーのピペッティング指示および以下のピペッティング手技確認手順を参照してください。

2. Flow-Count 標準粒子を 10秒から12秒間攪拌します。気泡の発生を最小限に抑えるため、過度の混和を避けます。
3. 試験管に 100µL の Flow-Count 標準粒子を分注します。気泡をピペットで取り除かないでください。
4. 液面が試験管の半分の高さになるように5秒間試験管を攪拌します。フローサイトメーターで測定する直前にもう一度攪拌します。
5. 絶対数測定が必要なサンプルについてステップ 1 から 4 を繰り返します。

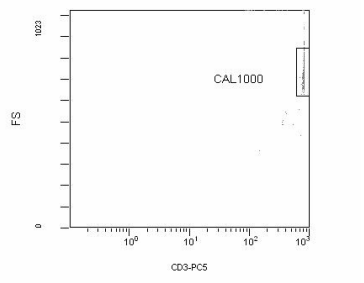
重要
サンプルは、Flow-Count 標準粒子添加後 2 時間以内に測定してください。アプリケーションによっては、Flow-Count 標準粒子添加から測定までの許容放置時間が短い場合があります。これについては、製品の取扱説明書を参照してください。

フローサイトメーターによる測定

アプリケーションに応じたサンプル解析方法については、その製品の取扱説明書を参照してください。

1. フローサイトメーターの散乱光と蛍光感度が正しく調整、標準化され、蛍光補正が設定されていることを確認します。各装置の製品マニュアルで手順を参照してください。
2. 製品の取扱説明書に従って、ヒストグラムを作成します。
3. FL4 LOG（または FL3 LOG、FL2 LOG、FL1 LOG）と FS または時間軸の2パラメータヒストグラムを追加します(図 1 参照)。Flow-Count 標準粒子（右上角）の周囲に直線（またはそれに相当する）ゲートを設定し、CAL とラベルします。
4. この取扱説明書に同封されているアッセイシートのFlow-Count 標準粒子アッセイ値を入力します。アッセイ値または CAL Factor の入力については、各装置の製品マニュアルを参照してください。

図 1
Cytomics FC 500 Flow Cytometer で測定した Flow-Count 標準粒子の各ヒストグラムを以下に示します。



重要
CAL リージョンがダブレット（前方散乱光が高いイベント）を除外して Flow-Count 標準粒子（シングレット）のメインポピュレーションを全て囲んでいること、および正しいアッセイ値が使用されていることを確認します。

5. 液面が試験管の半分の高さになるように5秒間試験管を攪拌します。
6. フローサイトメーターでサンプルを測定します。

重要:少なくとも 1,000イベント以上 の Flow-Count 標準粒子がカウントされていることを確認します。

ピペッティング手技確認手順

サンプルとFlow-Count 標準粒子の両方を正確かつ精密にピペッティングすることにより、最良の結果が得られます。以下の確認手順に従い、サンプルと Flow-Count 標準粒子を分注する際のピペッティング手技が精密であることを確認してください。

1. 試験管と風袋を化学天秤に置きます。
2. 目盛りをゼロに合わせます。
3. ピペットメーカーの指示に従って、100µL のサンプルまたは Flow-Count 標準粒子を試験管に分注します。
4. 試験管、風袋、および分注したサンプルまたは Flow-Count 標準粒子サンプルの重量を記録します。
5. 目盛りをゼロに合わせます。
6. ステップ 3 から 5 を繰り返して、サンプルまたは Flow-Count 標準粒子サンプルを少なくとも10回測定します。
7. 測定値の平均、標準偏差（±1 SD）、および % 変動係数（% CV）を計算します。
8. %CV が 2.0% 以下である必要があります。

絶対数測定

ベックマン・コールター社製のフローサイトメーターで絶対数を決定するには、「**フローサイトメーターによる測定**」の項のステップ 3 で CAL エリアに名前を付ける際に Flow-Count 標準粒子アッセイ値を入力します。少なくとも 1,000イベント以上 の蛍光粒子がカウントされると、そのサンプルの絶対数が以下の計算式を使用して自動的に計算されます:

$$\text{目的細胞の絶対数（細胞 / µL）} = \frac{\text{目的細胞の細胞数}}{\text{Flow-Count の測定数}} \times \text{Flow-Count 標準粒子アッセイ値}$$

サンプルが希釈されている場合は、上記計算式の結果を適切な希釈率で補正する必要があります。

精度管理

最良の結果を得るには、メーカーが推奨する頻度でピペットが較正されていることを確認してください。最良の結果を得るには、フローサイトメーターの散乱光と蛍光感度が正しく調整、標準化され、蛍光補正が設定されていることを確認してください。

各装置の製品マニュアルで手順を参照してください。

試薬の精度管理手順については、その製品の取扱説明書を参照してください。

制限事項

1. Flow-Count 標準粒子を使用する際の溶血システムには、IMMUNOPREP 試薬システムまたは NH_4Cl 溶血試薬 10倍濃厚液 (Stem-Kit 試薬の場合のみ) を用いてください。Flow-Count 標準粒子は他の溶血方法に使用できません。
2. 有機溶剤またはイオン強度の高い溶液を加えると、Flow-Count 標準粒子が不可逆な膨張または凝集をきたす恐れがあります。
3. 調製したサンプルは、Flow-Count 標準粒子添加後 2 時間以内に測定してください。
4. 装置に関する他の制限事項については、フローサイトメーター装置の製品マニュアルを参照してください。
5. 試薬に関する制限については、その製品の取扱説明書を参照してください。

性能特性

方法の正確性（相関性）
方法の正確性については、各試薬・機器の取扱説明書を参照してください。

直線性
方法の直線性については、各試薬・機器の取扱説明書を参照してください。

精密度
方法の精密度については、各試薬・機器の取扱説明書を参照してください。

参考文献

1. Rumke CL. 1995. The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: A warning. Blood Cells 11:137-140.
2. Rumke CL. 1995. Imprecision of the ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 11:311-314.
3. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.
4. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR and Burke DS. 1990. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients: Total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. J AIDS 3:144-151.

製品

Flow-Count 標準粒子
PN 7547053 – 200 テスト（20mL x 1）

ご不明な点や製品の不具合に関しましては、最寄りのベックマン・コールター社のホットライン（800-526-7694、北米のみ）、または最寄りのベックマン・コールター代理店にご連絡ください。

商標

Beckman Coulter のロゴ、COULTER、EPICS、Flow-Count、IMMUNOPREP、Stem-Kit、XL および XL-MCL は、Beckman Coulter, Inc. の登録商標または商標です。

US patent 5, 451, 525.

Beckman Coulter, Inc.
4300 N. Harbor Blvd.
Fullerton, CA 92835
www.beckmancoulter.com

製造販売元:ベックマン･コールター株式会社
東京都江東区有明二丁目5番7号

EC REP
Beckman Coulter Ireland Inc.
Mervue Business Park,
Mervue, Galway,
Ireland (353 91 774068)

Printed in USA
Made in USA

© 2007 Beckman Coulter, Inc.
版権所有